

METHOD FOR SEARCHING AGENT FOR STIMULATING DIFFERENTIATION OF OSTEOBLAST

Patent number: JP2002051798
Publication date: 2002-02-19
Inventor: NISHITANI YOICHI; SUGIMOTO SEIJI; UCHII MASAKO; KOSAKA NOBUO; TANAKA HIROYUKI
Applicant: KYOWA HAKKO KOGYO KK
Classification:
- International: **A61K31/277; A61K31/4422; A61K31/554; A61P3/14; A61P19/10; A61P43/00; C07D211/90; C07D281/10; C12N5/06; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/50; A61K31/275; A61K31/4422; A61K31/554; A61P3/00; A61P19/00; A61P43/00; C07D211/00; C07D281/00; C12N5/06; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/50; (IPC1-7): C07D211/90; C07D281/10; C12N5/06; C12Q1/02; A61K31/277; A61K31/4422; A61K31/554; A61P3/14; A61P19/10; A61P43/00; G01N33/15; G01N33/50; C12Q1/02; C12R1/91**
- european:
Application number: JP20000245385 20000811
Priority number(s): JP20000245385 20000811

Report a data error here

Abstract of JP2002051798

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for searching an agent for stimulating the differentiation of osteoblast, by which the search can be performed in a short time. **SOLUTION:** This method for searching the agent for stimulating the differentiation of the osteoblast, characterized by employing the calcium channel antagonism of the osteoblast as an index.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-51798

(P2002-51798A)

(43) 公開日 平成14年2月19日 (2002.2.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	デマコト* (参考)
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/277		A 6 1 K 31/277	4 B 0 6 3
31/4422		31/4422	4 B 0 6 5
31/554		31/554	4 C 0 3 6
A 6 1 P 3/14		A 6 1 P 3/14	4 C 0 5 4
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-245385(P2000-245385)

(22) 出願日 平成12年8月11日 (2000.8.11)

(71) 出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72) 発明者 西谷 陽一

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(72) 発明者 杉本 整治

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(72) 発明者 内井 雅子

静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醗酵工業株式会社医薬総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨芽細胞分化促進剤の探索方法

(57) 【要約】

【課題】 短時間で行うことのできる骨芽細胞分化促進剤の探索方法を提供すること。

【解決手段】 骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用を指標とする骨芽細胞分化促進剤の探索方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用を指標とする骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【請求項2】 骨芽細胞に、被験化合物を作用させ、当該細胞におけるカルシウムイオン流入量を測定し、該被験化合物がカルシウムイオン流入を抑制する化合物であるか判定し、カルシウムイオン流入を抑制する化合物を骨芽細胞分化促進剤として選択することを特徴とする請求項1記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【請求項3】 骨芽細胞における、被験化合物のカルシウムチャンネルに対する結合能を測定し、該被験化合物がカルシウムチャンネルに対する結合能を有する化合物であるか判定し、結合能を有する化合物を骨芽細胞分化促進剤として選択することを特徴とする請求項1記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【請求項4】 骨芽細胞の細胞株がMC3T3-E1細胞である請求項1～3のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【請求項5】 被験化合物がジヒドロピリジン、ベンゾチアゼピンおよびフェニルアルキルアミンから選ばれる構造を有する化合物である請求項1～4のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【請求項6】 被験化合物が骨芽細胞カルシウムチャンネル抗体である請求項1～4のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【請求項7】 被験化合物が骨芽細胞カルシウムチャンネル拮抗ペプチドである請求項1～4のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は骨芽細胞分化促進剤の探索方法に関する。

【0002】

【従来の技術】骨粗鬆症等の骨代謝異常症の治療法としては、女性ホルモン（エストロゲン等）、蛋白同化ステロイド、活性型ビタミンD類、カルシトニン、カルシウム剤、ビスホスホン酸類、ビタミンK₂、イプリフラボン、副甲状腺ホルモン、フッ素等の薬剤等の投与によるものがあげられる。

【0003】エストロゲンは、閉経後の女性におけるエストロゲン量低下に伴う閉経後骨粗鬆症に対して、欠乏したエストロゲンを補充する方法（エストロゲン補充療法）で用いられるが、子宮出血や乳房膨張等不快な副作用を引き起こし、子宮膜癌や乳癌を誘発させる可能性がある（特開平11-80005）。蛋白同化ステロイドも副作用を引き起こす（特開平11-180872）。

【0004】1 α -ヒドロキシビタミンD₃、1 α , 24(R)-ジヒドロキシビタミンD₃、1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃等の活性型ビタミンD類は、小腸ではカルシウムの吸収促進作用を有し、骨では骨吸収、骨形成を調節する

等の作用を有するため、骨密度および骨強度を向上させるが、患者の血中カルシウム濃度を上昇させる副作用がある（特開平11-60489）。また、活性型ビタミンD₃は局所投与では骨吸収作用を示すため、経皮、外用での投与が難しい（特開平11-180872）。

【0005】カルシトニンはその投与方法が筋肉内注射であるために、長期に亘る投与が必要とされ、骨粗鬆症の治療においては、患者に与える負担が大きい等の課題を有している（特開平11-130670）。また、カルシトニンは薬剤の耐性が出現しやすい（特開平11-180872）。さらに、カルシトニンは高カルシウム血症、高カルシウム尿症を起こしやすく、それに伴う尿路結石等の副作用の発現が問題となっている（特開平11-12192）。

【0006】カルシウム剤を用いた、高齢者や閉経後女性の骨粗鬆症に対するカルシウム補充療法が有効であると報告されており、主要な骨基質構成成分の1つであるカルシウムの製剤は他の上記薬剤に比べて安全性が高いという点から注目されている（特開平11-12192）。しかし、カルシウム剤は高カルシウム血症、高カルシウム尿症を起こしやすく（特開平11-180872）、また、骨強度を高める効果も十分ではない（特開平11-9221）。

【0007】ビスホスホン酸類は、活性化した破骨細胞に対して特異的に作用し、その活性を抑制することで骨吸収を抑制すると考えられ、骨粗鬆症をはじめカルシウム代謝異常に基づく疾患の治療薬として用いられている（特開平11-60489）。しかしながら、ビスホスホン酸類は骨形成を阻害する欠点があり（特開平11-180872）、骨量減少は抑制されるが、低下した骨量の回復は難しいと考えられている（特開平11-209284）。

【0008】ビタミンK₂は骨の形成を促進し、骨の破壊や吸収を抑制する作用を有しており、その骨破壊吸収抑制作用はイソプレニ基を有する側鎖が破骨細胞形成抑制作用に関与することによることが報告されている。しかしながら、ビタミンK₂は血液凝固作用を有しており、ワーファリンの投与を受けている患者には投与が禁忌である点に課題がある（特開平11-130670）。

【0009】骨形成促進作用をもつ蛋白質〔骨形成因子（BMPs）、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）等〕が知られているが、蛋白質製剤には経口吸収性、安定性、生産コスト等の問題がある（特開平11-209284）。骨代謝改善薬を目指した低分子化合物では、骨芽細胞増殖促進剤として、アミド化合物（特開平11-80107）、破骨細胞形成抑制剤として、イソプレノイド化合物（特開平11-130670）、骨吸収抑制剤として、ヒドロキシ-2-ピリドン誘導体（特開平11-180872）、インドール誘導体（特開平4-211651）、骨粗鬆症治療薬として、チアゾール化合物（特開平11-209284）、(R)-8-ヒドロキシ-2,6-ジメチル-2-オクテン酸（特開平11-209324）等が報告されている。

【0010】骨形成および骨吸収に関与する主要な細胞

は、それぞれ骨芽細胞および破骨細胞である。骨形成過程は、非石灰化骨基質（類骨）の形成とその石灰化に大別される。骨芽細胞は主要な骨基質蛋白として、I型コラーゲン、オステオポンチン、骨シアル酸含有プロテイン、オステオネクチン、デコリン、バイグリカン、オステオカルシン等骨基質に含まれる有機成分の90%以上を生産する。これら骨基質蛋白は非石灰化骨基質（類骨）を形成し、骨芽細胞はそれら骨基質を石灰化し、最終的には周囲の骨基質に埋め込まれて骨細胞となる。そのため、この骨芽細胞の増殖・分化を促進させる薬剤は骨形成を促進させる根本的な骨粗鬆症治療薬および予防薬となり得る。また、骨形成促進剤は骨折の治癒を早め、偽関節の治療、歯周病による歯槽骨減少の治療にも有効であると考えられている。

【0011】骨芽細胞の増殖促進の指標としては、培養細胞の増殖測定に、一般的に用いられる、細胞数、DNA量、蛋白質量、チミジン取り込み量等が知られているが、カルシウムチャンネルに対する作用に基づく、骨芽細胞の増殖促進指標は知られていない。骨芽細胞の分化促進の指標としては、アルカリフォスファターゼ活性の亢進、石灰化、オステオカルシン、オステオポンチン等の蛋白質、遺伝子の発現等が知られているが、カルシウムチャンネルに対する作用に基づく、骨芽細胞の分化促進指標は知られていない。また、骨芽細胞は分化するのに3~40日を要し、いずれの指標を利用しても短時間に化合物の骨芽細胞分化促進活性を測定することは困難であった。

【0012】ある種のジヒドロピリジン、フェニルアルキルアミン、ベンゾチアゼピン等は血管平滑筋のL型カルシウムチャンネルに拮抗的に作用し、降圧作用を示すことが報告されている[CLINICAL CALCIUM, 7, 7-10 (1997)]。骨芽細胞にカルシウムチャンネルが発現していることは報告されているが[Seminars in Nephrology, 18, 178-190 (1998)]、カルシウムチャンネルの骨芽細胞分化に対する作用は未解明であった。

【0013】L型カルシウムチャンネル作動薬であるジヒドロピリジン(DHP)系化合物BayK8644は、骨芽細胞のカルシウムチャンネルに対してカルシウムイオン流入促進作用を示すとともに、骨芽細胞の分化を促進することが報告されている[Bone, 5, S418 (1998)]。また、DHPに属するベニジピン、アムロジピン、ニフェジピンのうち、ベニジピンのみが骨芽細胞分化促進作用を有することが報告されている[Calcified Tissue International, 62, 554-556 (1998)]。骨代謝異常症の治療薬として、現在十分に満足できる薬剤はなく、骨疾病・骨障害の治療薬および予防薬、特に抗骨粗鬆症剤の探索方法が強く望まれている。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、短時間で行うことのできる骨芽細胞のカルシウムチャンネル

拮抗作用を指標とした骨芽細胞分化促進剤の探索方法を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明において、発明者らは鋭意検討の結果、骨芽細胞において、カルシウムチャンネル拮抗作用と骨芽細胞分化促進作用が相関することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の発明に関する。

【0016】(1) 骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用を指標とする骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【0017】(2) 骨芽細胞に、被験化合物を作用させ、当該細胞におけるカルシウムイオン流入量を測定し、該被験化合物がカルシウムイオン流入を抑制する化合物であるか判定し、カルシウムイオン流入を抑制する化合物を骨芽細胞分化促進剤として選択することを特徴とする上記(1)記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【0018】(3) 骨芽細胞における、被験化合物のカルシウムチャンネルに対する結合能を測定し、該被験化合物がカルシウムチャンネルに対する結合能を有する化合物であるか判定し、結合能を有する化合物を骨芽細胞分化促進剤として選択することを特徴とする上記

(1)記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【0019】(4) 骨芽細胞の細胞株がMC3T3-E1細胞である上記(1)~(3)のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【0020】(5) 被験化合物がジヒドロピリジン、ベンゾチアゼピンおよびフェニルアルキルアミンから選ばれる構造を有する化合物である上記(1)~(4)のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【0021】(6) 被験化合物が骨芽細胞カルシウムチャンネル抗体である上記(1)~(4)のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【0022】(7) 被験化合物が骨芽細胞カルシウムチャンネル拮抗ペプチドである上記(1)~(4)のいずれかに記載の骨芽細胞分化促進剤の探索方法。

【0023】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。被験化合物としては、例えば、ジヒドロピリジン、ベンゾチアゼピンおよびフェニルアルキルアミンから選ばれる構造を有する化合物、骨芽細胞カルシウムチャンネル抗体、骨芽細胞カルシウムチャンネル拮抗ペプチド等があげられる。

【0024】本発明に用いられる骨芽細胞としては、骨芽細胞に分化可能な細胞であれば、種や細胞株を問わず利用できる。例えば、個体より調製した初代培養の骨芽細胞を含む細胞群の培養系や樹立された細胞株が利用できる。初代培養骨芽細胞は、骨を有する生物であればいかなる種からも調製することができる。好ましくは、ヒト、サル、イヌ、ウサギ、ラット、マウス等の組織から調製できる。細胞株では、ゲッシ類のMC3T3-E1細胞、CR

P7/4、CRP10/30、ROS 17/2.8、UMR-106、RCJ3.1、RCB2.2、C3H10T1/2、ROB-C26、C2C12、ST-2等があり、ヒトのHOBITS、SV-HFO、hFOB3、MG-63、Saos-2、U2-OS、HOS T E85、Trabecule、HBDC、hMS (OB)、SaM-1等が知られており、好ましくはカルシウムチャンネルが発現していることが知られているUMR-106およびMC3T3-E1 [Connective Tissue Research, 35, 107-111 (1996)]、さらに好ましくは生体と同様の過程を経て分化するMC3T3-E1細胞を用いることができる。MC3T3-E1細胞は、該分化段階に応じて、コラーゲン、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン等を発現し、最終的に石灰化を起し、生体内と同様の過程を経て分化することから、in vitroでの骨芽細胞の分化について広く用いられている [日本臨床, 56, 1447-1453 (1998)]。

【0025】初代培養骨芽細胞の調製は既存のいかなる方法でも利用できる。初代培養細胞の調製方法としては骨組織より酵素消化により直接細胞を採取する酵素消化法、培養した小骨片から遊出した細胞を利用する骨移植片培養法等がある。酵素消化法では、例えば新生児マウスあるいはラットから以下のような方法で行うことができる。頭蓋骨を無菌的に取り出し、リン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBSと略す) にエチレンジアミン四酢酸四ナトリウムを最終濃度0.4 mmol/lとなるように添加した液に入れ、37℃の恒温槽で3～60分間、好ましくは約10分間振とうする。この処理を1～5回、好ましくは3回繰り返した後、頭蓋骨をPBS溶液で洗浄後、1～2000 U/ml、好ましくは約200 U/mlのコラゲナーゼ溶液を含むPBS溶液中で37℃、3～60分間、好ましくは約10分間振とうする。この酵素溶液を回収し、さらに新しい酵素溶液を加え、3～60分間、好ましくは約10分間酵素処理する。この酵素処理を2～10回、好ましくは3～6回繰り返す、骨芽細胞の割合が高くなる画分、通常2～10回目、好ましくは3～6回目の消化液に含まれる細胞を骨芽細胞様細胞として回収する。回収された細胞をPBSで洗浄し、1～30%の非動化ウシ胎児血清 (以下、FBSと略す) を含む α -最小必須培地 (α -MEM培地) に懸濁し、フラスコ中で37℃、5%CO₂下で培養する。骨移植片培養法では、例えばヒトあるいはラット、マウス等の骨片 (骨膜を含む) から以下のような方法で行うことができる。実体顕微鏡で骨片を2～3mm大に細切する。ディッシュあるいはプレートに数個の骨片を入れ、1～30%のFBSを含む α -MEM培地中、37℃、5%CO₂下で培養する。数日後、骨片から細胞が多数遊出してくる。遊出した細胞を分散するためPBSで洗浄し、トリプシン (trypsin) -エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液を添加し、37℃で3～60分間、好ましくは約10分間培養する。小骨片を除去後、細胞をビベティングで分散する。滅菌メッシュで細胞塊を除去後、細胞を1～30%のFBSを含む α -MEM培地中、37℃、5%CO₂下で培養する。

【0026】骨芽細胞の培養方法は、既存の培養方法で

あればいかなる方法でもよい。好ましくは、個々の骨芽細胞について公知の方法で培養できる。例えばMC3T3-E1細胞では、1～30% FBS、 α -MEM培地中で、CO₂インキュベータ (5% CO₂, 37℃) を用いて継代培養でき、細胞濃度が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 個/cm²の範囲で維持できるように2～4日に1回継代すればよい。また、UMR-106では、1～30% FBS、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) /Ham's F12培地中で、CO₂インキュベータ (5% CO₂, 37℃) を用いて継代培養でき、細胞濃度が $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 個/cm²の範囲で維持できるように2～4日に1回継代すればよい。

【0027】骨芽細胞分化促進剤の探索は、以下のようにして行うことができる。すなわち、骨芽細胞に被験化合物を作用させ、骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用を測定し、被験化合物がカルシウムチャンネル拮抗作用を有する化合物であるかを判定し、カルシウムチャンネル拮抗作用を有する化合物を骨芽細胞分化促進剤として選択することにより、骨芽細胞分化促進剤を探索することができる。

【0028】骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用の測定方法としては、カルシウムチャンネル拮抗作用の測定方法として既存の方法であればいかなる方法も利用することができ、例えばカルシウムチャンネルに対する結合能を測定する方法、カルシウムチャンネルを通した細胞内へのカルシウムイオンの流入の被験物質による抑制を測定する方法等があげられる。被験物質のカルシウムチャンネルに対する結合能は、放射能等でラベルした既知のカルシウム拮抗剤のカルシウムチャンネルからの解離促進能等によって測定することができる。カルシウムイオンの流入を起こさせる方法としては、例えばカルシウムチャンネル作動薬とカリウムイオンによりカルシウムイオン流入を起こさせる方法、細胞外に高濃度のカリウムイオンを添加することによりカルシウムイオン流入を起こさせる方法、バリノマイシン等のカリウムイオンフォアを細胞に添加することによりカルシウムイオン流入を起こさせる方法、バリウムイオン添加によりカルシウムイオン流入・バリウムイオン流入を起こさせる方法、微小電極により膜電位を脱分極させることによりカルシウムイオン流入を起こさせる方法、生理活性物質 (例えば、副甲状腺ホルモン、活性型ビタミンD₃、EGF等) によりカルシウムイオン流入を起こさせる方法等があげられる。好ましくは、カルシウムチャンネル作動薬とカリウムイオンによるカルシウムイオン流入を検出する系において、被験物質によるカルシウムイオン流入の抑制を調べる方法等がある。

【0029】カルシウムイオン流入の検出方法としては、既存のいかなる方法も利用でき、例えばパッチクランプ法によるカルシウム電流の抑制の測定、カルシウムインジケータであるエクオリン、カルシウムグリーン、fura-2、fura-2PE、fluo-3、quin-2等を用いた細胞内カルシウム濃度測定等があげられる。例えば、fura-2

を用いてMC3T3-E1細胞内カルシウム濃度の変化を測定する場合には、1ウェルあたり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個のMC3T3-E1細胞をセルデスクの入った24ウェルプレートで1~30% FBSを含む α -MEM培地中で一晩〜一週間培養する。細胞をハンクス平衡塩類溶液（以下、HBSSと略す）で1~5回洗浄し、200 μ L~1 mLのfura-2等のカルシウム蛍光指示薬1~20 μ mol/Lを含むHBSSを入れ、室温あるいは37°Cで30分間~1時間インキュベートする。fura-2溶液を除去後、HBSSで1~5回洗浄し、200 μ L~1 mLのHBSSを加えさらに37°Cで20~30分間インキュベートする。セルデスクを取り出し、2~3 mLのHBSSの入った石英ガラス製のキューベットに入れ、蛍光測定装置にセットする。細胞を37°Cで2~5分間インキュベートし、ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した試験化合物を加え（DMSO最終濃度0.1%~1%）、さらに30秒~2分間インキュベートする。Ca流入刺激物質（最終濃度10~40 mmol/L KCl、100 nmol/L~10 μ mol/L BayK 8644）を加え、Ca流入量を測定する。溶媒対照群のCa流入量を100%としたときの試験化合物によるCa流入量を算出し、Ca拮抗作用を評価することができる。

【0030】本発明により探索される化合物としては、カルシウムチャンネル拮抗作用を有する物質であればいかなるものも包含される。例えば、ジヒドロピリジン（DHP）に属するベニジピン、ニフェジピン、アムロジピン、メピロジピン、シルニジピン、ニトレンジピン、ニモジピン、イスラジピン、ニカルジピン、フェロジピン、マニジピン、ニルバジピン、ニソルジピン、バルニジピン、アラニジピン、エホニジピン等、フェニルアルキルアミンに属するベラパミル等、ベンゾチアゼピンに属するジルチアゼム、ベラパミル、ベプリジル等、抗体、ペプチド等があげられ、それらの水和物または溶媒和物も包含される。また、これらの物質の2以上を適宜組み合わせ用いてもよい。

【0031】本発明の方法により探索された骨芽細胞分化促進剤として有用な物質は、それ自体を医薬として投与してもよいが、通常は、有効成分である上記物質と製剤学的に許容される製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態で投与することが望ましい。このような医薬組成物には、他の医薬の有効成分、例えば、鎮痛剤、骨吸収抑制剤、抗生物質、抗菌剤、抗炎症剤等の1種または2種以上を適宜配合することが可能である。

【0032】生体内に適用するための医薬組成物は、有効成分である上記物質を製剤学的に許容される製剤用添加物の1種または2種以上と混合し、製剤学の分野において汎用の製剤方法に従って容易に製造することができる。本発明の方法により探索された骨芽細胞分化促進剤の投与経路は特に限定されず、治療および／または予防に際して最も効果的な経路を適宜選択することが望ましいが、好ましくは経口投与があげられる。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、カプセル剤、散剤、

錠剤、顆粒剤、シロップ剤等をあげることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、直腸内投与剤、注射剤、点滴剤等をあげることができるが、本発明の医薬の形態はこれらに限定されることはない。

【0033】経口投与に適当な医薬組成物のうち、例えばシロップ剤等の液体製剤は、水；蔗糖、ソルビット、果糖等の糖類；ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類；ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類；*p*-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤；ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等の製剤用添加物を用いて製造することができる。カプセル剤、錠剤、散剤、および顆粒剤等の固形製剤は、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニット等の賦形剤；でんぷん、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤；ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤；脂肪酸エステル等の界面活性剤；グリセリン等の可塑剤等を用いて製造することができる。

【0034】非経口投与に適する医薬組成物のうち、注射剤、点滴剤等の形態の液体製剤は、好ましくは滅菌された等張の液体製剤として調製することができる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、または塩水とブドウ糖溶液との混合物からなる水性媒体を用いて調製することができる。直腸内投与剤は、例えばカカオ脂、水素化脂肪または水素化カルボン酸等の担体を用いて、通常は坐剤の形態として調製することができる。なお、非経口投与用の医薬組成物の製造においても、経口剤で例示した希釈剤、フレーバー類、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤等から選択される1種または2種以上の製剤用添加物を適宜用いることができる。もっとも、医薬組成物の製造に用いられる製剤用添加物は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなるものを用いてもよい。

【0035】本発明の方法により探索された骨芽細胞分化促進剤の投与量および投与回数は特に限定されないが、一般的には、経口投与の場合には成人（60kg）一日当り6~6000mg、好ましくは60~3000mgが適当である。上記の投与量を1日1回ないし数回にわけて投与することができる。もっとも、上記の投与量および投与回数は、投与経路、患者の年齢および体重、治療および／または予防すべき骨疾患、骨障害の程度や基礎疾患の種類等の因子を考慮して適宜増減することが望ましい。

【0036】以下に、実施例、参考例と試験例を示すが、これらの例は、本特許の範囲を限定するものではない。

【0037】

【実施例】実施例1：骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用による骨芽細胞分化促進剤の探索方法
骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用をもつ化合物

の探索には、骨芽細胞株細胞株MC3T3-E1 [Jpn. Oral Biol., 23, 899-901 (1981)]を用いた。

【0038】カルシウムチャンネル拮抗作用をもつ化合物の探索は、細胞内カルシウム濃度指示薬fura-2を負荷した細胞へのカルシウムイオン流入の抑制を指標とすることで行った。すなわち、1ウェルあたり 5×10^5 個のMC3T3-E1細胞をセルデスクの入った24ウェルプレートで10% FBS (PAA Laboratories) を含む α -MEM培地中で一晩培養した。細胞をHBSSで1回洗浄し、500 μ Lの10 μ mol/L fura-2を含むHBSSを入れ、37°Cで1時間インキュベートした。fura-2溶液を除去後、HBSSで1回洗浄し、500 μ LのHBSSを加え、さらに37°Cで20分～30分間インキュベートした。セルデスクを取り出し、2 mLのHBSSの入った石英ガラス製のキューベットに入れ、蛍光測定装置 [CAF-110、日本分光 (株)] にセットした。細胞を37°Cで2分間インキュベートし、DMSOに溶解した試験化合物を加え (DMSO最終濃度0.1%)、さらに1分間インキュベートした。カルシウムイオン流入刺激物質 (最終濃度40 mmol/L KCl, 10 μ mol/L BayK 8644) を加え、カルシウムイオン流入量を測定した。溶媒対照群のCa流入量を100%としたときの試験化合物によるカルシウムイオン流入量を算出し、カルシウム拮抗作用を評価した。

【0039】結果を図1に示す。図1から明らかなように、ベニジピン、ニフェジピン、ジルチアゼム、ベラパミルおよびアムロジピンは骨芽細胞に対して濃度依存的にカルシウムイオン流入抑制作用を示した。ベニジピンは低濃度からカルシウムイオン流入を抑制し、高い活性を示した。一方、ニフェジピン、ジルチアゼム、ベラパミル、アムロジピンは高濃度で効果を示し、それらの活性はほぼ同等であった。

【0040】参考例1：錠剤
常法により、次の組成からなる錠剤を調製する。(R.S.) 3-エチル-5-メチル-2-(2-アミノエトキシメチル)-4-(2-クロロフェニル)-1,4-ジヒドロ-6-メチル-3,5-ピリジンジカルボン酸 ベンゼンスルホネート (アムロジピン) 10g、ラクトース316.8gおよび馬鈴薯でんぷん60gを混合し、これにヒドロキシプロピルセルロースの10%水溶液120gを加える。この混合物を常法により練合し、造粒して乾燥させた後、整粒し打錠用顆粒とする。これにステアリン酸マグネシウム1.2gを加えて混合し、径8mmの杵をもった打錠機 (菊水社製RT-15型) で打錠を行って、錠剤 (1錠あたり活性成分5 mgを含有する) を得る。

処方

アムロジピン	5.0 mg
ラクトース	158.4 mg
馬鈴薯でんぷん	30.0 mg
ヒドロキシプロピルセルロース	6.0 mg
ステアリン酸マグネシウム	0.6 mg
	200.0 mg

【0041】参考例2：カプセル剤

常法により、次の組成からなるカプセル剤を調製する。アムロジピン50g、アビセル1145gおよびステアリン酸マグネシウム5gを常法により混合する。この混合物をカプセル充填機 (Zanasi社製、LZ-64型) により、ハードカプセル4号 (1カプセルあたり120mg容量) に充填し、カプセル剤 (1カプセルあたり活性成分5mgを含有する) を得る。

処方

アムロジピン	5.0 mg
アビセル	114.5 mg
ステアリン酸マグネシウム	0.5 mg
	120.0 mg

【0042】参考例3：肛門坐剤

常法により、次の組成からなる直腸投与用の製剤を調製する。ウィテプゾール™ H15 (ダイナマイトノーベル社製) 673.55gおよびウィテプゾール™ E75 (ダイナマイトノーベル社製) 288.65gを40～50°Cで溶解させる。これに1,4-ジヒドロ-2,6-ジメチル-3,5-ピリジンジカルボン酸4-(2-ニトロフェニル)ジメチルエステル (ニフェジピン) 10g、第一リン酸カリウム13.6gおよび第二リン酸ナトリウム14.2gをそれぞれ均一に混合分散させる。ついで該混合分散したものをプラスチック製の坐剤の型に充填した後、徐々に冷却して肛門坐剤 (1製剤あたり活性成分10mgを含有する) を得る。

処方

ニフェジピン	10 mg
ウィテプゾールH15	673.55 mg
ウィテプゾールE75	288.65 mg
第一リン酸カリウム	13.6 mg
第二リン酸ナトリウム	14.2 mg
	1,000 mg

【0043】試験例1：選択された化合物の骨芽細胞分化促進作用

骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用をもつ化合物の骨芽細胞分化促進作用の試験は、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (以下、ALPと略す) 活性と細胞のDNA量を測定することで行った。すなわち、1ウェルあたり 1.7×10^4 個のMC3T3-E1細胞を96ウェルプレートで10% FBSを含む α -MEM培地中で培養した。培養開始4日後にDMSOに溶解した試験化合物 (DMSO最終濃度0.1%) および0.1%ウシ血清アルブミンを含む

α -MEM培地中に交換し、37℃のCO₂インキュベーターで10日間培養した。この培養期間中に試験化合物を含む培地を2度交換した。その後、細胞を1回PBSで洗浄し、1ウェルあたり150 μ Lの6.7 mmol/Lのp-ニトロフェニルリン酸溶液を加え、15~30分間室温で反応させた。反応を1ウェルあたり50 μ Lの1 mol/LのNaOHを入れることで停止し、マイクロプレートリーダーで405 nmの吸光度を測定した。吸光度からp-ニトロフェノールの生成量を計算し、ALP活性を求めた。試験化合物のDNA量に対する影響の測定はFratzl-Zelmanらの方法 [Bone, 20, 225-236 (1997)] に従った。すなわち、ALP活性測定と同様の方法で細胞を生育させたあと、PBSで洗浄し、-20℃で凍結させた。細胞を室温に取り出し、1ウェルあたり50 μ Lの5 μ g/mLのHoechst33258溶液を加え、蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した (励起光355 nm、蛍光波長460 nm)。DNA量をウシ胸腺DNAを用いて作製した検量線から求めた。

【0044】分化促進活性を単位DNA量あたりのALP活性で比較した結果を図2および図3に示す。数値はベニジピンでの最大活性を100%としたときの値で表されている。図2および図3から明かなように、ベニジピン、ニフェジピン、ジルチアゼム、ベラパミル、アムロジピンは濃度依存的に骨芽細胞の分化を促進した。ベニジピンは低濃度から単位DNA量あたりのALP活性を促進し、高い活性を示した。一方、ニフェジピン、ジルチアゼム、ベラパミル、アムロジピンは高濃度で効果を示し、それらの活性はほぼ同等であった。実施例1および本試験例1の結果から、構造の異なるカルシウムチャンネル拮抗剤の間にも、カルシウムチャンネル拮抗作用と骨芽細胞分化促進活性に相関があることが示された。

【0045】試験例2：カルシウムチャンネル作動薬の骨芽細胞分化促進作用

試験例1と同様の方法により、ALP活性に対するカルシウムチャンネル作動薬BayK8644の効果を検討した。結果を図4に示す。カルシウムチャンネル作動薬のBayK8644

はそれ自体でALP活性に影響を及ぼさないが、500 pmol/Lのベニジピンによる分化促進を濃度依存的に抑制し、5 μ mol/Lで完全に抑制した。このことから、骨芽細胞分化促進作用がカルシウムチャンネル拮抗作用によるものであることが強く示唆された。

【0046】

【発明の効果】本発明は、短時間で行うことのできる骨芽細胞のカルシウムチャンネル拮抗作用を指標とした骨芽細胞分化促進剤の探索方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【図1】種々の化合物の細胞内カルシウムイオン流入に対する効果を表すグラフである。縦軸は薬剤無添加時のカルシウムイオン流入量に対する割合(%)を、横軸はlog(濃度(mol/L))を表す。

【図2】種々の化合物のALP活性に対する効果を表すグラフである。縦軸はベニジピンによる最大反応に対する割合(%)を、横軸はlog(濃度(mol/L))を表す。

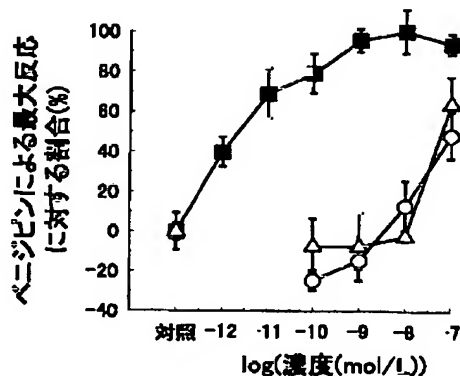
【図3】種々の化合物のALP活性に対する効果を表すグラフである。縦軸はベニジピンによる最大反応に対する割合(%)を、横軸はlog(濃度(mol/L))を表す。

【図4】BayK8644の単独および500 pmol/Lのベニジピンとの共存下でのALP活性に対する効果を表すグラフである。縦軸は500 pmol/LベニジピンによるALP促進活性に対する割合(%)を、横軸はlog(BayK8644の濃度(mol/L))を表す。

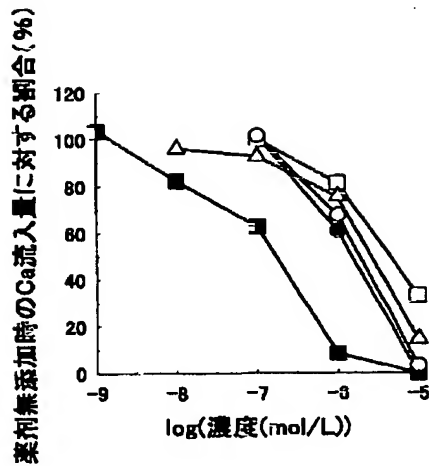
【符号の説明】

- ：ベニジピン
- ：ジルチアゼム
- ：ベラパミル
- ：ニフェジピン
- △—：アムロジピン
- ◆—：BayK8644+500 pmol/Lベニジピン
- ◇—：BayK8644のみ

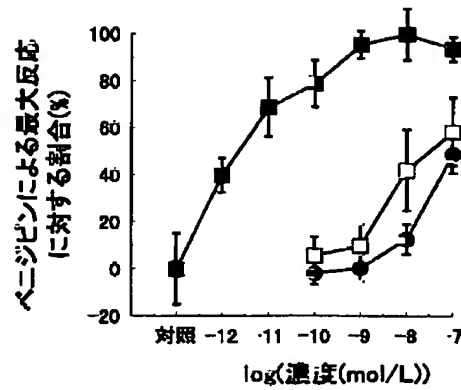
【図2】



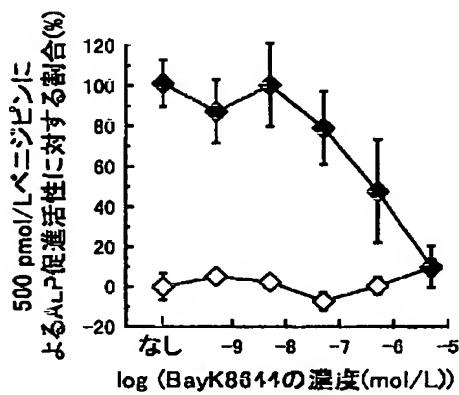
【図1】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

識別記号

F I

(参考)

A 6 1 P 19/10

A 6 1 P 19/10

4 C 0 8 6

43/00

1 1 1

43/00

1 1 1

4 C 2 0 6

G 0 1 N 33/15

G 0 1 N 33/15

Z

33/50

33/50

Z

X

// C 0 7 D 211/90

C 0 7 D 211/90

281/10

281/10

C

C 1 2 N 5/06

(C 1 2 Q 1/02

(C 1 2 Q 1/02

C 1 2 R 1:91)

C 1 2 R 1:91)

C 1 2 N 5/00

E

(9) 開2002-51798 (P2002-51798A)

(72)発明者	小坂 信夫	Fターム(参考)	2G045 BB14 BB50 BB51 CB01 CB13
	静岡県駿東郡長泉町下土狩1188		DA36 FB01
	工業株式会社医薬総合研究所内		4B063 QA01 QQ61 QQ79 QR48 QR77
(72)発明者	田中 博之		QS22 QS33 QS36 QX02
	静岡県駿東郡長泉町下土狩1188		4B065 AA91X CA24
	工業株式会社医薬総合研究所内		4C036 AB03 AB05 AB10 AB14 AB20
			4C054 AA07 BB03 CC01 DD04 DD08
			DD12 EE19 FF05 FF11 FF17
			4C086 AA02 BC25 BC26 BC92 NA14
			ZA97 ZC02 ZC50
			4C206 AA02 HA13 KA01 MA51 MA55
			MA57 MA72 NA14 ZA97 ZC02
			ZC50